TOYOBO

- DNA Ligation Kit -

Ligation high

(Code No.LGK-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

ー　目次　ー

[1] はじめに . . . . . (1)
[2] プロトコール . . . . . (1)
1. 使用方法
2. 効率よくライゲーション反応をおこなうために
[3] Ligation highの特長 . . . . . (2)
1. ライゲーション効率が優れています。
2. 少ない液量で反応できます。
3. 安定性に優れています。
[4] 実施例 . . . . . (3)
1. インサート挿入ライゲーション
2. リンカーライゲーション
3. ファージライゲーション
4. 電気泳動による確認
5. 塩濃度の影響
[5] 関連商品一覧 . . . . . (8)

ご注意）

本キットに含まれる試薬はすべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意して下さい。

[1] はじめに

DNAフラグメントのライゲーションは、遺伝子操作実験で頻繁に行われる操作です。従来のライゲーション反応は、基質に応じて条件を設定し、各反応組成を別々に添加するなど煩雑でした。また、インサート挿入ライゲーション等の場合、高い形質転換効率を得ることが困難でした。

そこで東洋紡ではこれらの問題を解決するために、ライゲーション反応を簡単な操作で、かつ高い効率で完了させるキットを開発しました。本キットの反応液にはライゲーション反応に必要な試薬はすべて含まれており、多種類のライゲーションに適用できます。なお、本説明書ではLigation highを用いた時の標準的な結果を示しました。

[2] プロトコール

1. 使用方法

- 本品は-20℃で保存してください。
- Ligation highの融解を氷中で行います。5～10分で自然融解します。
- ライゲーションに使用するDNA溶液を調製、準備します。
- DNA液量と半分量～同量のLigation highを混合します。
- 16℃にて30分間反応させます。
- 反応液は、反応終了後そのまま形質転換に使用できます。

2. 効率よくライゲーション反応をおこなうために

- ライゲーション効率が悪いときは、エタノール沈殿等でDNAを精製してください。
- 反応液量を抑えたいときは、使用するDNA液量を少量にして、半分量のLigation highと混合して下さい(2ページご参照)。
- コンピテントセルに多量の反応液を添加すると、形質転換効率が低下しますのでご注意下さい。多量の反応液を添加する必要がある場合は、DNAをエタノール沈殿等にて濃縮してから実施してください。
- ライゲーション効率は、塩濃度によって影響を受けます。高いライゲーション効率を得たい場合は、塩を含まないTE buffer[*1]でDNAを溶解した後、ライゲーション反応を実施してください(7ページご参照)。

[*1] 10mM Tris-HCl,pH8.0 / 1mM EDTA

[3] Ligation highの特長[*1]

1. ライゲーション効率が優れています。

   T4 DNA Ligaseを用いた場合よりも50倍以上の効率が得られます。

2. 少ない液量で反応できます。

   Ligation highはDNA溶液と半分量～同量混合して使用します。

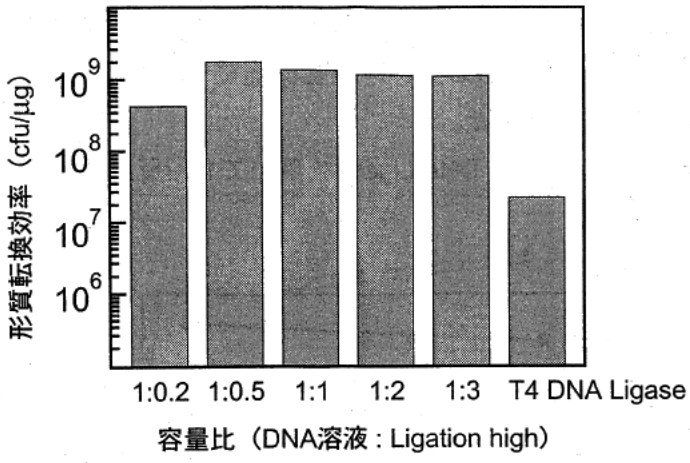


図1 容量比 (DNA溶液 : Ligation high)による形質転換効率の違い

3. 安定性に優れています。

   50回の凍結融解を行ってもライゲーション効率の低下は認められません。

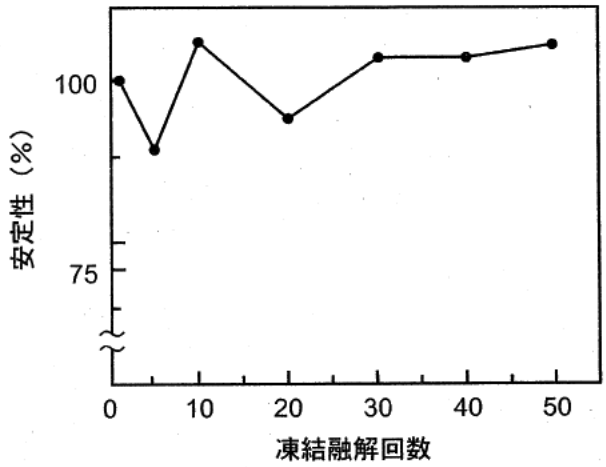


図2 凍結融解による形質転換効率の変化

[*1] 本ページの実験結果はすべてセルフライゲーションによる結果です。セルフライゲーションは7ページと同様 (TE bufferに溶解) の方法を用いました。

[4] 実施例

1. インサート挿入ライゲーション

(1) 方法

- 脱リン酸化したpBluescript® II ／*Ban* III (50ng, 25fmol) に、pUC18／*Taq* I の1,444bp断片 (5～125ng, 5～125fmol) を加えたDNA溶液を5μl調製した。
- DNA溶液と同量 (5μl) または半分量 (2.5μl) の Ligation high を混合し、16℃で30分反応させた。
- *E.coli* JM109のコンピテントセル[*1]を反応液2μlで形質転換し、X-Gal、IPTGおよびアンピシリンを含むLBプレート上で培養し、生育した白コロニー数より形質転換効率を測定した。
- コントロールとして、T4 DNA Ligaseを用いて16hr反応したものを用いた。

(2) 結果および考察

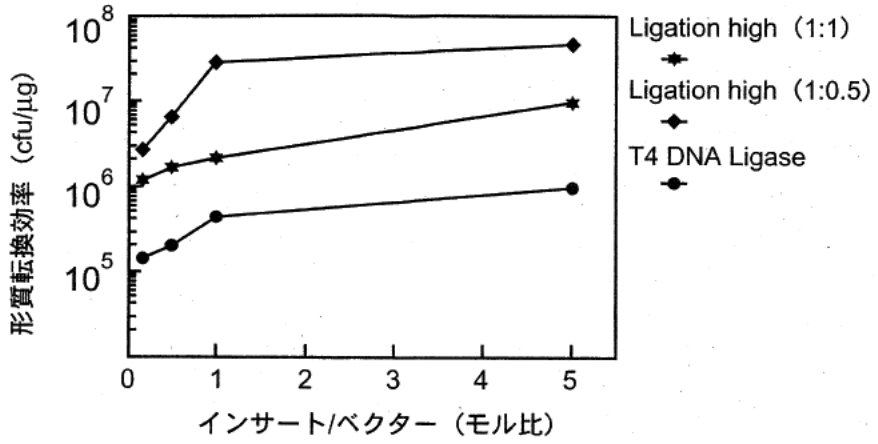


図3 ライゲーション効率に及ぼすインサート／ベクターのモル比の影響

表2 全コロニーに対する白コロニーの割合

(%)

インサート／ベクター (モル比)	Ligation high (容量比1:1)	Ligation high (容量比1:0.5)	T4 DNA Ligase
0.2	52	63	12
0.5	50	65	21
1.0	56	61	27
5.0	66	72	39

- インサート／ベクターのモル比は 1.0以上で良好な結果を得ました。

[*1] 形質転換効率は1.07×10^9cfu/μg pBluescript® II

2. リンカーライゲーション

(1) 方法

- 脱リン酸化した pBluescript® II ／*Hinc* II (100ng, 50fmol)、リン酸化した*Eco* R I リンカー(2.6～130ng, 0.5～25pmol)を加えたDNA溶液を5μl調製した。
- DNA溶液と同量（5μl）または半分量（2.5μl）のLigation highを混合し、16℃で30分反応させた。
- *E.coli* JM109のコンピテントセル[*1]を反応液2μlで形質転換し、X-Gal、IPTGおよびアンピシリンを含むLBプレート上で培養し、生育した白コロニー数より形質転換効率を測定した。
- コントロールとして、T4 DNA Ligaseを用いて16hr反応したものを用いた。

(2) 結果および考察

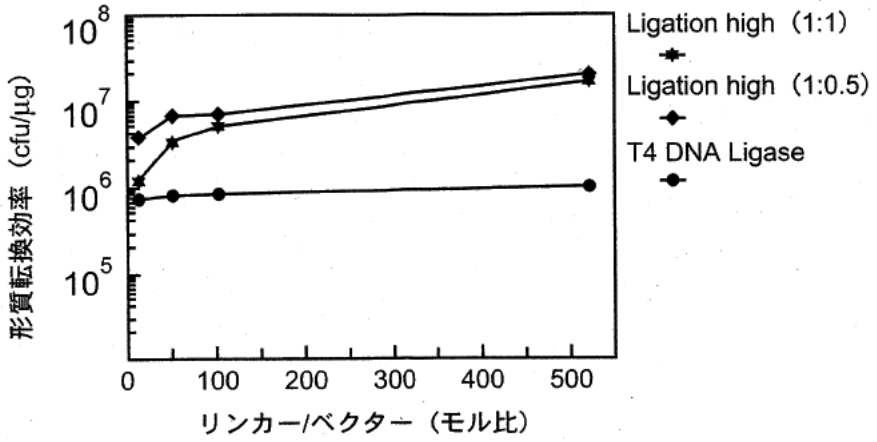


図3 ライゲーション効率に及ぼすリンカー／ベクターのモル比の影響

表2 全コロニーに対する白コロニーの割合

(%)

リンカー／ベクター（モル比）	Ligation high（容量比1:1）	Ligation high（容量比1:0.5）	T4 DNA Ligase
10	51	57	23
50	54	65	24
100	57	64	38
500	54	76	38

- リンカー／ベクターのモル比は100以上で良好な結果を得ました。

[*1] 形質転換効率は1.07×10^9cfu/μg pBluescript® II

3. ファージライゲーション

(1) 方法

- λ ZAP®II の *Eco*R I arm (250ng) に、Test Insert (200ng) を加えたDNA溶液を5μl調製した。
- DNA溶液と同量 (5μl) または半分量 (2.5μl) のLigation highを混合し、16℃および26℃で10分～1時間反応させた。
- 反応液4μlをGIGAPACK®III Goldを用いてインビトロパッケージングし、*E.coli* XL1-Blueに感染させ形質導入効率を測定した。
- コントロールとして、T4 DNA Ligaseを用いて16hr反応したものを用いた。

(2) 結果および考察

表3 ファージライゲーションにおける反応条件の影響

(pfu/μg λ ZAP®II)

反応条件	Ligation high (1:1)	Ligation high (1:0.5)	T4 DNA ligase
16℃ x10min	2.20×10^5	7.68×10^6	-
16℃ x30min	5.20×10^5	8.32×10^6	-
16℃ x60min	3.00×10^6	1.15×10^7	-
16℃ x16hr	3.21×10^6	9.35×10^6	2.15×10^5
26℃ x10min	4.80×10^5	5.12×10^6	-
26℃ x30min	1.20×10^6	3.20×10^6	-
26℃ x60min	2.00×10^6	3.84×10^6	-
26℃ x16hr	1.19×10^6	3.56×10^6	3.09×10^5

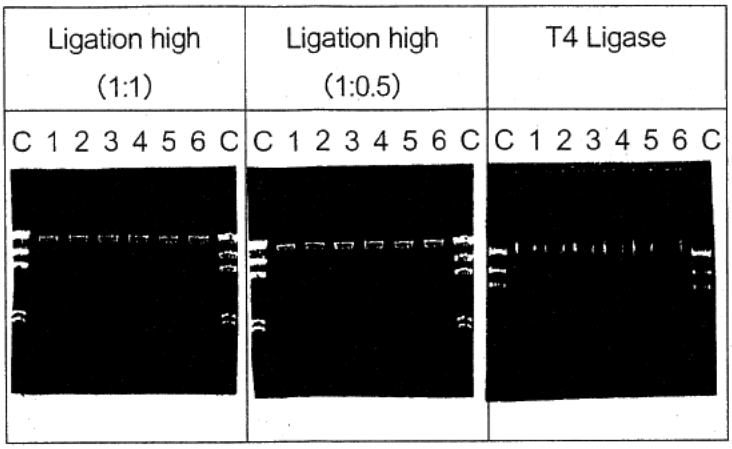
- 反応温度は、16℃と26℃の間でライゲーション効率に顕著な差は認められませんでした。
- 反応時間は、30分で十分なライゲーション効率が得られました。

4. 電気泳動による確認

(1) 方法

- λ／*Hind*IIIのフラグメント(500ng)5μlと、同量(5μl)または半分量(2.5μl)のLigation high を混合し、16℃にて反応させた。
- 反応終了後、エタノール沈殿にてDNAを回収した後、1%アガロースゲルにアプライして電気泳動を行った。
- コントロールとして、T4 DNA Ligase を用いて反応させたものを用いた。

(2) 結果および考察



C: Control（未処理）
1: 16℃ x 5min　　4: 16℃ x30min
2: 16℃ x10min　　5: 16℃ x 1hr
3: 16℃ x20min　　6: 16℃ x16hr

図4 ライゲーション反応液の電気泳動パターン

- λ／*Hind*IIIは反応5分でもライゲーションされました。

ご注意

- フラグメント末端形状によってはライゲーションが起こりにくいことがありますので、ライゲーション効率が低い場合は、反応時間を伸ばしてみてください。
- 反応液はそのまま電気泳動のサンプルとして用いることができますが、鮮明な電気泳動パターンを得たい場合は、エタノール沈殿により、バッファー交換して実施してください。

5. 塩濃度の影響

(1) 方法

- pBluescript® II ／*Sca* I (5ng)を、塩(NaCl)を添加したTE buffer 5μlに溶解した。
- DNA 溶液と同量（5μl）または半分量（2.5μl）の Ligation high を混合し、16℃で30分反応させた。
- *E.coli* JM109のコンピテントセル[*1]を反応液2μlで形質転換し、アンピシリンを含むLBプレート上で培養し、生育したコロニー数より形質転換効率を測定した。

(2) 結果及び考察

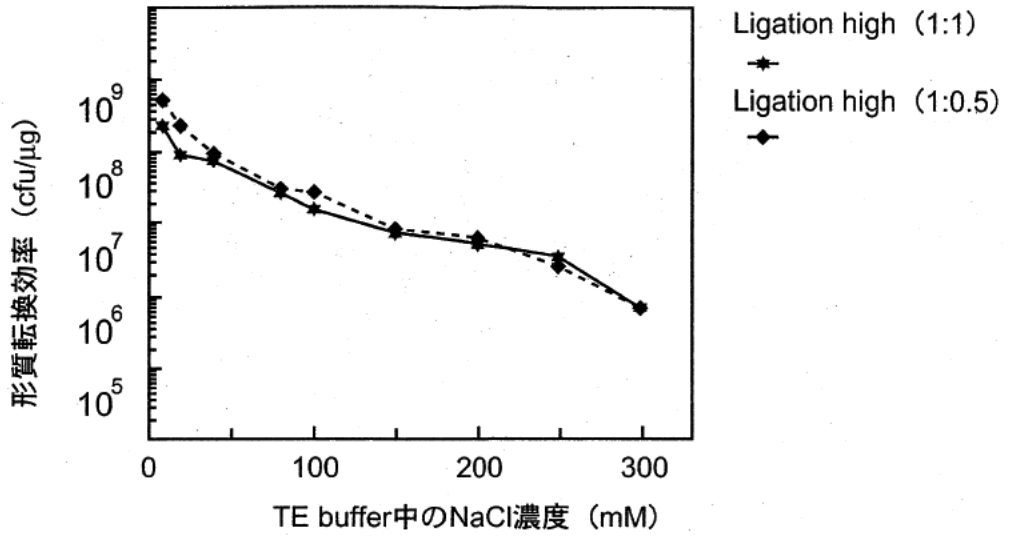


図5 セルフライゲーションによる形質転換効率

- DNAを溶解するbufferに塩が含まれていると、形質転換効率は低下する傾向にあります。 高い形質転換効率を得たいときは、 塩を含まない TE buffer に DNA を溶解してください。

[*1] 形質転換効率は1.17×10^{9}cfu/μg pBluescript® II

[5] 関連商品一覧

商品名	Code No.
T4 DNA Ligase	LGA-111
λ /*Hin*d III digest	DNA-010
Competent high *E.coli* JM109	DNA-900
pUC18 DNA	PUC-018

【製造・販売元】

TOYOBO 東洋紡績株式会社

－納期・注文に関するお問い合わせ－

ライフサイエンス事業部（大阪）
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目２番８号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

ライフサイエンス事業部（東京）
〒103-8530　東京都中央区日本橋小網町 17 番９号
TEL 03-3660-4819　FAX 03-3660-4951
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間　9:00～12:00 ， 13:00～17:00（土、日、祝を除く）
E-mail : techosk@bio.toyobo.co.jp
［URL］http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience.html